

## Artículo Original

# *Farmacogenética del Acenocumarol\**

## *Pharmacogenetic of the Acenocoumarol*

**Dr. José Zarza Ortiz<sup>1</sup>**

### RESUMEN

El tratamiento anticoagulante oral con fármacos cumarínicos es ampliamente utilizado en todo el mundo para la prevención de la recurrencia en las trombosis arteriales y venosas. La respuesta a los cumarínicos depende de varios factores como el sexo, la edad, la dieta, los fármacos y probablemente factores genéticos. En este trabajo estudiamos la importancia que pueden tener los factores genéticos en la sensibilidad al acenocumarol.

### SUMMARY

Oral anticoagulant therapy with coumarin derivatives is used broadly to prevent recurrent arterial and venous thrombosis. The response to coumarin derivatives depends on several factors, such as sex, age, diet, drugs and probably genetics factors. In this paper, we studied the role of these genetics factors on acenocoumarol sensitivity.

### INTRODUCCIÓN

Se recogen aquí los resultados de nuestro estudio sobre los factores genéticos implicados en la modulación del tratamiento anticoagulante oral con acenocumarol. Este es un campo de gran importancia práctica ya que este tratamiento es ampliamente utilizado en todo el mundo. El acenocumarol es muy eficaz, pero tiene como inconveniente las enormes diferencias en la respuesta de cada individuo <sup>(1)</sup>. En los últimos años se ha sugerido la importancia de factores genéticos en la sensibilidad a los anticoagulantes orales (ACO), sobre todo algunos polimorfismos del citocromo P-450 CYP2C9 <sup>(2,3,4)</sup> que es la principal enzima involucrada en la metabolización de los ACO <sup>(5,6,7)</sup>. Sin embargo, hasta el presente trabajo, no existía ningún estudio que hubiera demostrado la existencia de una asociación entre estas variantes y la sensibilidad al acenocumarol. Tampoco existían trabajos que hubieran explorado de forma exhaustiva la presencia de nuevas variantes en el gen CYP2C9 que pudieran explicar las diferentes sensibilidades observadas en diversos grupos de pacientes. Nuestro trabajo se centrará en el análisis de las principales variantes genéticas del citocromo P-450 CYP2C9 en un grupo de pacientes anticoagulados con acenocumarol y en la búsqueda de nuevas variantes que pudieran ser importantes en la sensibilidad individual de

1) Departamento de Hematología. Cátedra de Semiología Médica. Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Médicas.

\*) Resumen de Tesis Doctoral en Medicina y Cirugía. Universidad de Navarra (España)

los pacientes al efecto anticoagulante del fármaco. También exploraremos el propéptido del factor VII de la coagulación con la intención de buscar alguna variante genética que pudiera explicar los bajos requerimientos de acenocumarol en algunos de nuestros pacientes.

## MATERIAL Y MÉTODOS

La recogida de muestras para el estudio se llevó a cabo en el año 2001. Los individuos participantes fueron reclutados en el Hospital Clínico Universitario de Salamanca, Universidad de Salamanca (España). Reclutamos 113 pacientes anticoagulados con acenocumarol. Dichos pacientes recibían una dosis estable de acenocumarol al menos en los tres meses previos a la extracción del DNA. Todos los pacientes incluidos tenían un INR entre 2 y 3,2 en el momento de la extracción del DNA. Los pacientes con enfermedad hepática ( $n = 2$ ) y enfermedad tiroidea ( $n = 2$ ) fueron excluidos del estudio. Los 109 pacientes finalmente incluidos fueron agrupados en tres categorías según las dosis de acenocumarol requeridas: en el grupo de dosis baja se incluyeron 43 pacientes que recibían una dosis de acenocumarol menor o igual a 7 mg por semana; en el de dosis intermedia se incluyeron 45 pacientes que recibían una dosis de acenocumarol mayor a 7 mg y menor de 28 mg por semana; finalmente, en el grupo de dosis alta se incluyeron 21 pacientes que recibían una dosis de acenocumarol igual o mayor a 28 mg por semana. De los participantes se recogieron los siguientes datos: sexo, edad, dosis semanales de acenocumarol (en miligramos), INR del día de extracción del DNA, motivo de la anticoagulación, enfermedades asociadas y consumo de otros fármacos.

Se utilizaron los equipos y reactivos adecuados para la realización de los estudios de biología molecular. Se realizó la determinación del INR de cada paciente, utilizando el método estándar habitual.

Para el análisis genético utilizamos la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el segmento de DNA en el que se encontraban las variantes alélicas, para posteriormente realizar una digestión con enzimas de restricción específicas para cada variante. Se realizó la secuenciación de los nueve exones del gen del citocromo P-450 CYP2C9

y de las regiones intrónicas adyacentes. Se diseñó además una PCR específica para estudiar el propéptido del factor VII de la coagulación.

### Estadística descriptiva

Se hizo un estudio descriptivo de las variables cuantitativas y cualitativas para determinar las características de la población estudiada. La normalidad de las variables cuantitativas se verificó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de Lilliefors. Como las variables estaban distribuidas normalmente, se expresaron como media (desviación estándar). Las variables cualitativas se expresaron bien como frecuencias absolutas, bien como porcentajes.

### Estadística inferencial

Se utilizó el ANOVA de un criterio para comparar el INR y la edad entre los tres grupos de dosis. Las diferencias en los requerimientos de acenocumarol entre portadores y no portadores de CYP2C9\*3 en el grupo de bajas dosis se evaluaron mediante el test de T de Student para muestras independientes. Posteriormente se utilizó un modelo de regresión logística ordinal, en primer lugar univariante, para evaluar el riesgo de presentar bajos requerimientos de acenocumarol de cada factor por separado. Finalmente, se realizó un modelo multivariante para evaluar el efecto de las variantes alélicas y de la edad (variables independientes) sobre los requerimientos de acenocumarol (variable dependiente). En el modelo multivariante se incluyeron las variables que fueron significativas en el modelo univariante y aquellas con tendencia a la significación ( $p < 0,25$ ). Así se podía establecer la posible relación entre la dosis como variable ordinal (baja, media, o alta) y las variantes alélicas y la edad, controlando las variables sexo y empleo de fármacos. La adecuación del modelo se evaluó mediante el test de bondad de ajuste de Pearson. Los heterocigotos y homocigotos fueron incluidos en la misma categoría debido a la baja prevalencia de pacientes homocigotos en ambos casos.

**RESULTADOS:** En el estudio realizado se incluyeron 109 pacientes en tratamiento anticoagulante oral con acenocumarol que fueron seleccionados según los criterios indicados en el apartado de Material y Métodos. En las siguientes tablas se presentan los resultados.

**Tabla 1.** Frecuencia de la variante CYP2C9\*3 en pacientes con diferentes requerimientos de acenocumarol.

CYP2C9*3	Dosis baja (n = 42)	Dosis intermedia (n = 45)	Dosis alta (n = 21)
<b>Ausente</b>	30 (71,4%)	43 (95,6%)	20 (95,2%)
<b>Heterocigoto</b>	11 (26,2%)	2 (4,4%)	1 (4,8%)
<b>Homocigoto</b>	1 (2,4%)	—	—
<b>Frecuencia alélica</b>	15,5%	2,2%	2,3%

**Tabla 2.** Frecuencia de la variante CYP2C9\*2 en pacientes con diferentes requerimientos de acenocumarol.

CYP2C9*2	Dosis baja (n = 43)	Dosis intermedia (n = 44)	Dosis alta (n = 21)
<b>Ausente</b>	30 (69,8%)	29 (65,9%)	20 (95,2%)
<b>Heterocigoto</b>	11 (25,6%)	14 (31,8%)	1 (4,8%)
<b>Homocigoto</b>	2 (4,6%)	1 (2,3%)	—
<b>Frecuencia alélica</b>	17,4%	17,8%	2,3%

Se investigó además la presencia de las variantes Ile181Leu y Leu208Val en 106 pacientes, ninguno de los cuales era portador de estas variantes alélicas.

**Tabla 3** Frecuencia de la variante C-1189 del promotor CYP2C9 en pacientes con diferentes requerimientos de acenocumarol.

C-1189	Dosis baja (n = 40)	Dosis intermedia (n = 44)	Dosis alta (n = 21)
<b>Ausente</b>	15 (37,5%)	21 (47,3%)	17 (80,9%)
<b>Heterocigotos</b>	17 (42,5%)	16 (36,7%)	3 (14,3%)
<b>Homocigoto</b>	8 (20%)	7 (15,9%)	1 (4,8%)
<b>Frecuencia alélica</b>	41,2%	34,1%	11,9%

### Estudio de los factores asociados a los requerimientos de acenocumarol mediante regresión logística ordinal

#### Análisis univariante

Se realizó un análisis univariante que incluyó las variantes CYP2C9\*2 y CYP2C9\*3, el alelo C-1189 del promotor de CYP2C9, la edad, el sexo y el consumo de fármacos. El objetivo de este análisis fue evaluar la probabilidad de precisar bajos requerimientos de acenocumarol asociado a cada factor por separado. La variante CYP2C9\*3, la presencia del alelo C-1189 del promotor y la edad avanzada incrementaban significativamente la probabilidad de re-

querir dosis de acenocumarol bajas, por lo que se incluyeron en el análisis multivariante. Aunque el efecto de la variante CYP2C9\*2 sobre la probabilidad de presentar bajos requerimientos no fue significativo, consideramos que esta variante podía ser importante en el análisis multivariante ya que presentaba una  $p < 0,25$ , motivo por el cual también fue incluida en el análisis. En cuanto al sexo y a las interacciones farmacológicas, se excluyeron del modelo multivariante por la baja significación estadística que presentaban ( $p = 0,41$  y  $p = 0,29$  respectivamente). En la **tabla 4** se presenta el resultado del análisis univariante.

**Tabla 4.** Análisis Univariante mediante regresión logística ordinal.

Variable	OR	IC 95%	p (wald)
<b>CYP2C9*2</b>	1,89	0,84-4,23	0,1221
<b>CYP2C9*3</b>	8,06	2,11-30,30	0,0022
<b>Alelo C-1189</b>	2,98	1,42-6,28	0,0041
<b>Edad (años)</b>	1,11	1,05-1,16	< 0,0001
<b>Sexo</b>	1,36	0,65-2,81	0,4122
<b>Fármacos</b>	1,78	0,60-5,23	0,2963

**Tabla 5.** Tabla de contingencia de presencia del alelo C-1189 y la dosis en sujetos no portadores de CYP2C9\*2 ni CYP2C9\*3.

C-1189	Dosis baja (n = 20)	Dosis intermedia (n = 27)	Dosis alta (n = 19)
<b>Ausente</b>	15 (75%)	17 (63%)	17 (89,5%)
<b>Presente</b>	5 (25%)	10 (37%)	2 (10,5%)

#### Análisis Multivariante

Se realizó un análisis multivariante para evaluar la influencia de CYP2C9\*2, CYP2C9\*3, el alelo C-1189 del promotor de CYP2C9 y la edad sobre la probabilidad de precisar bajos requerimientos de acenocumarol. Curiosamente, el alelo C-1189 del promotor de CYP2C9, cuya influencia era significativa en el modelo univariante, dejaba de serlo en el multivariante ( $p = 0,518$ ) y además se producían desajustes que hacían inviable el modelo, debido al marcado desequilibrio de ligamiento que existía entre C-1189 y las variantes CYP2C9\*3 y CYP2C9\*2: la mayoría de los portadores de CYP2C9\*2 y CYP2C9\*3 presentaban el alelo C-1189 del promotor. De los 27 portadores de CYP2C9\*2 en los que se pudo genotipar la variante del promotor, 25 (92,6%) presentaban el alelo C-1189; además, los 15 pacientes portadores de la variante CYP2C9\*3 presentaban el alelo C-1189. Un rasgo a destacar es que el único portador homocigoto de CYP2C9\*3 era también portador homocigoto del alelo C-1189 del promotor. Por el contrario, de 52 portadores homocigotos de T-1189 sólo dos pacientes eran portadores de CYP2C9\*2 o CYP2C9\*3. Por tanto, para esclarecer si el alelo C-1189 era o no importante en el requerimiento de acenocumarol recurrimos a estudiarlo en aquellos pacientes no portadores de CYP2C9\*2 ni CYP2C9\*3. En la tabla 5 se presenta la tabla de contingencia del alelo C-1189 y la dosis en pacientes sin CYP2C9\*2 ni CYP2C9\*3.

A continuación se realizó un análisis multivariante en este subgrupo de pacientes sin CYP2C9\*2 ni CYP2C9\*3 para valorar con más precisión el papel del alelo C-1189. El resultado ajustado por edad no fue estadísticamente significativo ( $p = 0,532$ ). Es decir, este resultado indicaba que la presencia del alelo C-1189 no afectaba a los requerimientos de acenocumarol y que el gran efecto observado en el análisis univariante se debía a su asociación con CYP2C9\*2 y CYP2C9\*3 y no a un efecto propio. Por otro lado, en los datos presentados en la tabla 12 se observa que los portadores del alelo C-1189 parecen presentar una menor frecuencia en el grupo de dosis alta en comparación con los de los grupos de dosis baja e intermedia. Para valorar si esto era o no importante, se realizó un test de Chi-cuadrado de Pearson cuyo resultado no fue significativo ( $p = 0,128$ ), indicando que aunque parecía haber una tendencia a no requerir una dosis muy alta si se era portador del alelo C-1189 esto no se puede concluir de forma definitiva: se necesitaría realizar estudios con un mayor número de pacientes para confirmar dicha tendencia.

En el modelo final se incluyeron la edad y las variantes CYP2C9\*2 y CYP2C9\*3. Los resultados de este modelo se presentan en la **tabla 6**. Para medir si existía discrepancia entre lo que predecía el modelo y lo que se observaba en los datos obtenidos realizamos un test de bondad de ajuste de *Pearson*. En este caso no existió discrepancia ya que el resultado no fue significativo ( $p = 0,125$ ) y esto indicó la validez del modelo utilizado.

Tabla 6. Modelo multivariante.

Variante	OR Ajustada	IC 95%	P (wald)
<b>CYP2C9*3</b>	6,02	1,53-23,64	0,0101
<b>CYP2C9*2</b>	2,70	1,09-6,73	0,0325
<b>Edad (años)</b>	1,12	1,07-1,17	<0,0001

Test de bondad de ajuste:  $p = 0,125$ .

Los portadores de CYP2C9\*3 presentaban una probabilidad notablemente elevada (seis veces mayor) de requerir una dosis menor de acenocumarol en comparación con los no portadores de esta variante alélica. También los portadores de CYP2C9\*2 tenían una mayor probabilidad de requerir menos acenocumarol que los no portadores, si bien ésta no era tan acusada como en el caso de CYP2C9\*3.

Otro resultado destacable y novedoso es el que hace referencia al efecto de la edad: por cada año aumenta un 12% la probabilidad de necesitar una dosis baja de acenocumarol. Nuestro estudio es, por tanto, el primero que atribuye a la edad un efecto sobre el requerimiento de este anticoagulante.

Una vez analizada cada variable por separado, quisimos estudiar si existían interacciones entre ellas que condicionaran las dosis requeridas de fármaco: se estudió la interacción entre las variantes CYP2C9\*2 y CYP2C9\*3 para ver si el efecto de una variante dependía de la presencia de la otra, obteniéndose un resultado no significativo ( $p = 0,78$ ), lo que indica que no existe tal interacción; a continuación se evaluó la interacción entre CYP2C9\*2 y la edad para ver si el efecto de la edad dependía de la presencia de la variante CYP2C9\*2: el resultado tampoco fue significativo ( $p = 0,27$ ), como tampoco lo fue el obtenido al analizar la interacción entre la edad y CYP2C9\*3 ( $p = 0,43$ ). En definitiva, al no existir ninguna interacción entre las tres variables, aceptamos el modelo presentado en la tabla 13 como modelo final: tanto la variante CYP2C9\*3 como la CYP2C9\*2 y la edad influyen por sí mismas en el requerimiento de acenocumarol de forma significativa.

Para profundizar en el gran efecto de CYP2C9\*3 sobre las dosis de acenocumarol realizamos un test *T de Student*, con la intención de evaluar las diferencias en los requerimientos de este anticoagulante en el grupo de dosis baja entre portadores y no portadores de la variante: dentro de ese grupo, los portadores de CYP2C9\*3 requerían dosis aún menores que los no portadores. Para corroborar este hallazgo original de la importante influencia de la variante 2C9\*3, pudimos describir por primera vez en la literatura médica un paciente portador homocigoto que durante el tratamiento con acenocumarol precisó dosis extre-

madamente bajas de acenocumarol (entre 1,25 y 5 mg semanales) a pesar de lo cual presentó periodos de coagulación supratrapéutica y un episodio de hemorragia digestiva grave.

#### Secuenciación del gen del citocromo P-450 CYP2C9

Se secuenciaron los nueve exones del gen del citocromo P-450 CYP2C9, incluidas las regiones intrónicas adyacentes, en un grupo seleccionado de pacientes que, por sus características (requerimientos de dosis baja o alta de acenocumarol sin condicionantes genéticos conocidos), contaban con mayores posibilidades de ser portadores de algún factor genético con influencia en las dosis del fármaco. No se observaron anomalías en la secuencia de los pacientes.

#### Secuenciación de la región del gen del factor VII de la coagulación que codifica el propéptido

Con la hipótesis de que podría existir alguna variante en el propéptido del factor VII de la coagulación que explicara la sensibilidad al acenocumarol en nuestros pacientes se intentaron identificar variantes en el propéptido del factor VII en un grupo seleccionado de diez pacientes con bajos requerimientos de acenocumarol que no recibían fármacos que alteraran su metabolización ni eran portadores de CYP2C9\*3. De nuevo encontramos que ninguno de ellos tenía alteraciones en la secuencia del propéptido.

## DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en este trabajo demuestran por primera vez que las variantes CYP2C9\*3 y CYP2C9\*2 aumentan la sensibilidad al efecto anticoagulante del acenocumarol pero, a diferencia de trabajos previos realizados con warfarina, la variante CYP2C9\*3 tiene un efecto mucho mayor que la variante CYP2C9\*2. Asimismo, demostramos por primera vez que la edad del paciente condiciona la sensibilidad al acenocumarol. Por otro lado, las variantes Ile181Leu y Leu208Val del exón 4 de CYP2C9, no existen y en realidad son artefactos debidos al empleo de una técnica inadecuada de amplificación del DNA. La variante C-1189T del promotor de CYP2C9 no parece tener un papel importante en

la sensibilidad al acenocumarol. Aunque no hemos encontrado nuevas variantes, creemos que éstas existen y que deberían buscarse en grupos seleccionados de pacientes particularmente sensibles o resistentes al acenocumarol cuya peculiar respuesta al tratamiento no pueda explicarse por los factores genéticos o ambientales conocidos hasta el momento. Finalmente, podemos decir que la sensibilidad a los ACO no se puede explicar por un único factor, sino que se debe a la interacción de múltiples factores genéticos y ambientales, como lo demuestran nuestros resultados. El conocimiento de estos factores permitirá personalizar el tratamiento y de este modo se aumentará la seguridad de la terapéutica anticoagulante. Por este motivo, nuestros resultados tienen trascendencia clínica ya que contribuyen al conocimiento de los factores con influencia en la sensibilidad al efecto anticoagulante del acenocumarol.

## CONCLUSIONES

1. Hemos demostrado por primera vez que ser portador de la variante CYP2C9\*3 se asocia con una mayor probabilidad de precisar una dosis baja de acenocumarol.
2. Los pacientes portadores de la variante CYP2C9\*2 tienen una probabilidad entre dos y tres veces mayor de precisar una dosis más baja de acenocumarol que los no portadores de esta variante alélica.
3. Contrariamente a lo que se ha descrito en la literatura con la warfarina, la variante alélica 2C9\*3 del citocromo P-450 condiciona mucho más la sensibilidad al tratamiento con acenocumarol que la variante 2C9\*2.
4. La edad es un factor muy importante en la sensibilidad al tratamiento anticoagulante oral con acenocumarol, ya que por cada año de edad la probabilidad de necesitar una dosis baja de acenocumarol se incrementa un 12%.
5. Las variantes alélicas Ile181Leu y Leu208Val del citocromo P-450 CYP2C9 no existen,
6. Hemos demostrado por primera vez en una población caucásica la presencia de la variante C en la posición -1189 del promotor de CYP2C9. Esta variante se encuentra en desequilibrio de ligamiento con CYP2C9\*2 y CYP2C9\*3 y no tiene influencia en la sensibilidad al tratamiento anticoagulante con acenocumarol.
7. No hemos encontrado nuevas variantes de CYP2C9 en una serie de pacientes seleccionados por su muy alta o muy baja sensibilidad al acenocumarol y carentes de otros factores que la expliquen, ni tampoco mutaciones en el propéptido del factor VII de la coagulación en el grupo de pacientes con muy alta sensibilidad al acenocumarol y carentes de otros factores que la expliquen.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Hirsh J, Dalen J, Anderson DR, Poller L, Bussey H, Ansell J, Deykin D. Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. *Chest* 2001;119(1 Suppl):8S-21S.
2. Thijssen HH, Flinois JP, Beaune PH. Cytochrome P4502C9 is the principal catalyst of racemic acenocoumarol hydroxylation reactions in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 2000;28:1284-90.
3. Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol* 2000;1:REVIEWS3003.
4. Goldstein JA. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *Br J Clin Pharmacol* 2001;52:349-55.
5. Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ, Daly AK. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet* 1999;353:717-9.
6. Taube J, Halsall D, Baglin T. Influence of cytochrome P-450 CYP2C9 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment. *Blood* 2000;96:1816-9.
7. Margaglione M, Colaizzo D, D'Andrea G, Brancaccio V, Ciampa A, Grandone E, Di Minno G. Genetic modulation of oral anticoagulation with warfarin. *Thromb Haemost* 2000;84:775-8.